 doi：10.16380/j.kcxb.2017.09.004

灰飞虱羧酸酯酶 LsCarE1 介导杀虫剂抗性

王 芮[1]，张浩淼[1]，邓 蕾[1]，肖倩倩[1]，王秋霞[1]，刘广娜[2]，韩召军[1]，吴 敏[1,*]

（1．南京农业大学植物保护学院，南京 210095；2．吉林农业科技学院，吉林 132101）

摘要：【目的】我们前期的研究发现，在灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 抗毒死蜱品系、抗吡虫啉品系和抗溴氰菊酯品系中的总酯酶活力都明显升高。本研究旨在筛选导致总酯酶活力升高的酯酶基因并验证其在抗药性中的作用。【方法】通过转录组测序和 RT-qPCR 比较抗、感灰飞虱品系雌成虫中各个酯酶基因的表达量；采用显微注射技术建立超量表达灰飞虱羧酸酯酶基因的果蝇品系；并利用生物测定技术检测过量表达灰飞虱酯酶基因的果蝇对毒死蜱、吡虫啉和溴氰菊酯的敏感性。【结果】通过转录组数据和 RT-qPCR 筛选到羧酸酯酶基因 *LsCarE*1（GenBank 登录号：HM600723）在 3 个灰飞虱抗性品系中均过量表达。将 *LsCarE*1 基因按黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 偏好的密码子优化后构建转基因载体质粒 pUAST-attB-$LsCarE1^{Optimized}$，成功建立纯合的转基因果蝇品系 UAS-$LsCarE1^{Optimized}$。利用 GAL4 启动品系 da-gal4 与 UAS-$LsCarE1^{Optimized}$ 品系杂交，获得超量表达 *LsCarE*1 的果蝇品系 da＞$LsCarE1^{Optimized}$。定量 PCR 检测发现，目标基因 *LsCarE*1 在超量表达品系 da＞$LsCarE1^{Optimized}$ 中的表达量是对照品系 UAS-$LsCarE1^{Optimized}$ 中表达量的 257.3 倍；而另一对照品系 da＞gal4 中没有检测到 *LsCarE*1 的表达。此外，黑腹果蝇内源的酯酶同源基因表达量显著低于目标基因的表达量。生物测定结果显示，与对照组 da＞gal4 果蝇品系相比，启动超量表达 *LsCarE*1 的转基因果蝇 da＞$LsCarE1^{Optimized}$ 对毒死蜱和吡虫啉的耐药性分别提高了 4.19 和 2.46 倍，但对溴氰菊酯的耐药性无显著变化。【结论】*LsCarE*1 的过量表达与灰飞虱对毒死蜱和吡虫啉的抗性相关。

关键词：灰飞虱；代谢抗性；羧酸酯酶；转基因果蝇；超量表达

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2017)09-1006-07

Carboxylesterase LsCarE1 mediates insecticide resistance in *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae)

WANG Rui[1], ZHANG Hao-Miao[1], DENG Lei[1], XIAO Qian-Qian[1], WANG Qiu-Xia[1], LIU Guang-Na[2], HAN Zhao-Jun[1], WU Min[1,*] (1. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin 132101, China)

Abstract:【Aim】In our previous studies, the activities of total esterases were found to be significantly increased in the chlorpyrifos, imidacloprid and deltamethrin resistant strains of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. The aim of this study is to identify the carboxylesterase gene causing this increase and to verify its roles in insecticide resistance.【Methods】The expression levels of carboxylesterase genes in female adults of the resistant and susceptible strains of *L. striatellus* were detected by transcriptome sequencing and RT-qPCR. Microinjection was used to establish a transgenic *Drosophila melanogaster* strain overexpressing the target gene. Topical application method was used to investigate the responses of transgenic *D. melanogaster* overexpressing the target gene to chlorpyrifos, imidacloprid and deltamethrin, respectively.【Results】The expression level of *LsCarE*1 (GenBank accession no.: HM600723) was upregulated in female adults of the chlorpyrifos, imidacloprid and deltamethrin resistant strains of *L. striatellus*. Based on the sequence of *LsCarE*1, codon optimization was

基金项目：国家重点研发计划子课题“稻麦及经济作物病虫草害精准快速选药技术及产品研发”(2016YFD0200501-4)
作者简介：王芮，女，1991 年 10 月生，山东济宁人，硕士研究生，研究方向为昆虫毒理学，E-mail：2014102097@njau.edu.cn
* 通讯作者 Corresponding author，E-mail：wu12min@njau.edu.cn
收稿日期 Received：2017-06-21；接受日期 Accepted：2017-08-03

performed, and the open reading frame of *LsCarE*1 was cloned into the transgenic vector pUAST-attB. The transgenic homozygous strain UAS-*LsCarE1*^{Optimized} was successfully established and then genetically crossed with the GAL4 driver line to obtain a da > *LsCarE1*^{Optimized} strain that exhibited the overexpression of *LsCarE*1. The expression level of *LsCarE*1 in the da > *LsCarE1*^{Optimized} strain was 257.3 times as high as that in the reference strain UAS-*LsCarE1*^{Optimized}. The expression of *LsCarE*1 was not detected in the reference strain da > gal4. Furthermore, the expression levels of the endogenous esterase homologous genes in *D. melanogaster* were significantly lower than that of *LsCarE*1. The bioassay results indicated that as compared with the control strain da > gal4, the overexpression strain da > *LsCarE1*^{Optimized} showed increased tolerance to chlorpyrifos and imidacloprid by 4.19- and 2.46-fold, respectively, but showed no significantly increased tolerance to deltamethrin. 【Conclusion】The overexpression of *LsCarE*1 is related to the increased resistance to chlorpyrifos and imidacloprid in *L. striatellus*.

Key words: *Laodelphax striatellus*; metabolic resistance; carboxylesterase; transgenic *Drosophila*; overexpression

灰飞虱 *Laodelphax striatellus*(Fallén)属半翅目(Hemiptera)飞虱科(Delphacidae),广泛分布于菲律宾至西伯利亚一带的亚洲和欧洲稻区(Kisimoto, 1989)。由于化学杀虫剂的不合理施用,灰飞虱对多种杀虫剂产生了抗药性(高保立, 2008)。研究表明,羧酸酯酶在昆虫抗药性的形成中起着重要作用。例如,在抗双硫磷的埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 品系中,羧酸酯酶活性比敏感品系的要高(Lima *et al.*, 2011);抗溴氰菊酯的白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 的羧酸酯酶比活力也明显高于敏感品系(刘洪霞等, 2012);多杀菌素对甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 的羧酸酯酶活性具有诱导作用(王光峰等, 2003);用亚致死剂量的氯虫苯甲酰胺连续处理小菜蛾 *Plutella xylostella* 5 代后,处理组羧酸酯酶活性显著高于对照组,表明羧酸酯酶很有可能参与了小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性(邢静等, 2011)。因此,已有大量的研究描述了羧酸酯酶与昆虫代谢抗性的相关性。其次,还有进一步通过基因干扰等手段验证羧酸酯酶功能的研究。例如,Zhang JQ 等(2013)通过沉默东亚飞蝗 2 个羧酸酯酶基因 *LmCesA*1 和 *LmCesA*2 后,发现飞蝗对毒死蜱敏感性增强,证明了这 2 个酯酶可能参与毒死蜱的解毒代谢。但是,RNAi 技术很难对靶标基因实现完全的沉默(Mao *et al.*, 2007; Huvenne and Smagghe, 2010),并且存在脱靶效应。因此,需要有其他方法能够有效地对解毒酶的功能进行验证。转基因果蝇超量表达技术是一项利用整合酶或转座酶将靶基因高效整合进入果蝇染色体,再利用 GAL4/UAS 系统实现靶基因在果蝇特定的细胞、组织或特定的发育时期进行超量表达的技术,最后通过生物测定来验证靶基因与杀虫剂抗性的关系。例如,Daborn 等(2012)利用果蝇转基因系统超量表达了分别来自铜绿蝇 *Lucilia cuprina*、冈比亚按蚊 *Anophele gambiae* 和烟粉虱 *Bemisia tabaci* 的 *αE*7, *GstE*2 和 *CYP*6*cm*1 基因,验证了这 3 个解毒酶基因的过量表达与杀虫剂抗药性有关,证明了转基因果蝇超量表达系统是验证昆虫解毒酶功能的可靠手段。

本研究前期通过抗性筛选获得了抗毒死蜱、抗吡虫啉和抗溴氰菊酯 3 个灰飞虱抗性品系,并通过生化试验发现:与敏感品系相比,上述 3 个抗性灰飞虱品系中酯酶活力显著上升(徐鹿, 2013; 冯爱, 2013)。本文在上述研究基础上进一步通过定量 PCR 的方法筛选到在 3 个抗性品系中都过量表达的羧酸酯酶基因 *LsCarE*1,并利用转基因果蝇超量表达技术对其进行功能验证,深入研究 LsCarE1 在灰飞虱抗性中的作用,为灰飞虱抗性的监测和治理提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

灰飞虱敏感品系于 2009 年采自江苏建湖,在室内不接触任何药剂连续饲养 7 年;灰飞虱抗溴氰菊酯品系于 2009 年采自江苏建湖,在室内用溴氰菊酯连续筛选 30 代以上,抗性达到 1 072.0 倍(Xu *et al.*, 2013),进行本研究时抗性倍数为 987.20 倍;灰飞虱抗毒死蜱品系于 2009 年采自江苏建湖,在室内用毒死蜱连续筛选 25 代以上,抗性达到 158.50 倍(Xu *et al.*, 2014),进行本研究时抗性倍数为 126.20 倍;灰飞虱抗吡虫啉品系于 2010 年采自江苏建湖,在室内用吡虫啉连续筛选 30 代以上,抗性达到13.90倍(Elzaki *et al.*, 2016),进行本研究时抗性倍数为 21.80 倍。果

蝇 BDSC#35568 是转基因接受品系，在 3 号染色体上有便于外源基因插入的 attp 位点（87B10），其基因型为（$y^1 w^*$；P{nos-phiC31\int. NLS}X；PBac{y + -attP-3B}VK00040）；果蝇 BDSC#3619（brm^2 e^s ca^1/TM6B，Sb^1 Tb^1 ca^1）是 3 号染色体的平衡子；果蝇 BDSC#8641（W^{1118}；P{da-GAL4. w^-}3）是 GAL4 启动品系；W^{1118} 由东南大学发育与疾病相关基因实验室提供。供试果蝇用由玉米粉、酵母粉、蔗糖和琼脂做成的人工饲料饲养，实验室饲养条件为光周期 16L∶8D，温度 25 ± 2℃，相对湿度 60% ~70%。

1.2 供试试剂

98.5% 溴氰菊酯原药由拜耳作物科学有限公司生产，96.5% 毒死蜱原药和 97% 吡虫啉原药由南京红太阳集团生产。TRIzol 总 RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司；LA Taq DNA 聚合酶，dNTP，DL5000 DNA Marker，M-MLV 反转录酶和荧光定量 PCR 试剂盒购自宝生物工程（大连）有限公司；凝胶纯化试剂盒购自 Axygen 公司；质粒小提试剂盒购自 Omega 公司；无内毒素质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司；pEASY-T3 Cloning Kit 和感受态细胞 Trans5α 购自北京全式金公司；限制性内切酶购自 Thermo 公司；T4 连接酶购自 Promega 公司。

1.3 三个抗性灰飞虱品系中 *LsCarE*1 的表达量分析

分别挑选 3 -4 日龄的抗毒死蜱、抗吡虫啉和抗溴氰菊酯灰飞虱雌成虫，提取总 RNA。总 RNA 经电泳检测和浓度测定后，用反转录试剂盒进行 cDNA 第 1 链的合成，然后对合成的 cDNA 进行 RT-qPCR 分析。运用 Beacon Designer 7 软件设计实时荧光定量 PCR 引物（表 1），以灰飞虱延伸因子基因（*EF*-1）和真核翻译起始因子 3 亚基基因（*eIF*-3）为内参基因（王芮等，2016）。RT-qPCR 反应体系：2 ×SYBR Premix Ex Taq™ 10 μL，上游和下游引物（10 μmol/L）各 0.8 μL，50 × Rox Reference Dye Ⅱ 0.4 μL，cDNA 1 μL，ddH_2O 7 μL。反应条件：95℃ 30 s；95℃ 5 s，60℃ 31 s，共 40 个循环，反应后进行熔解曲线分析。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因 Genes	引物序列（5′-3′） Primer sequences	用途 Purpose
*LsCarE*1	F：GCTTCGCACAACACAGCACC R：GGATCCTTGAATCGGCGGGG	检测灰飞虱抗性品系中基因表达量时靶基因的荧光定量 PCR 引物 Primers for target gene in detection of gene expression level in the resistant strains of *Laodelphax striatellus* in real-time quantitative PCR assay
EF-1	F：TCGAGTCCTTCCAGGAGTTC R：CGACAGATCCTTCTGCGTTA	检测灰飞虱抗性品系中基因表达量时所用的内参基因引物 Primers for the reference gene in detection of gene expression level in the resistant strains of *L. striatellus* in real-time quantitative PCR assay
eIF-3	F：TCAATGACGATATCCCACGA R：GAGTGTTGGCACCGTGTATG	
LsCarE1^{Optimized}*C*	F：TTTTCAGGGCGCCATGGATCCGGCCACCATGGCTCTGAAATTGGCAGT R：CTAGTACTTCTCGACAAGCTTGGTGCATCTGGGAAGTGTTTCTTC	构建转基因质粒 pUAST-attB-*LsCarE1*^{Optimized}引物 Primers for construction of the transgenic plasmid pUAST-attB-*LsCarE1*^{Optimized}
LsCarE1^{Optimized}*RT*	F：GCTTCGCACAACACAGCACC R：GGATCCTTGAATCGGCGGGG	转基因果蝇品系中目标基因荧光定量 PCR 引物 Primers for target gene of transgenic *Drosophila* strains in real-time quantitative PCR assay
*RE*16761*p*	F：CACGACATCGTCTTGGTTTC R：CCACCAAATGATGCAATGTT	
*F121496p*1	F：CACGACATCGTCTTGGTTTC R：CCACCAAATGATGCAATGTT	
RE24825p	F：TGTGCATGTGATTGATTTGC R：TGGGCCTTCAGTAGAGGAGT	
β-Actin	F：CAGGCGGTGCTTTCTCTCTA R：AGCTGTAACCGCGCTCAGTA	转基因果蝇品系中内参基因荧光定量 PCR 引物 Primers for reference gene of transgenic *Drosophila* strains in real-time quantitative PCR assay
RPL32	F：AAGAAGCGCACCAAGCACTTCATC R：ACGCACTCTGTTGTCGATACCCTT	

1.4　转基因载体的构建

根据 GenBank 中灰飞虱 *LsCarE*1 基因（GenBank 登录号：ADR73023.1）序列，按照黑腹果蝇蛋白表达的偏好进行密码子优化，并合成该基因（南京金斯瑞公司）。通过设计引物（表 1），利用同源重组酶 Exnase® Ⅱ（南京诺唯赞生物科技有限公司）将优化后 *LsCarE*1 的开放阅读框序列整合进入转基因载体 pUAST-attB 的多克隆位点，获得转基因质粒 pUAST-attB-*LsCarE1*^{Optimized}。提取无内毒素转基因质粒 DNA，置于 −20℃备用。

1.5　转基因果蝇品系的建立

显微注射的方法参考 Spradling 和 Rubin（1982）。用构建好的转基因质粒 pUAST-attB-*LsCarE1*^{Optimized}以 500 μg/mL 的浓度注射新鲜的 BDSC#35568 果蝇胚胎。将注射完成的胚胎放入培养箱。经数小时培养后，把孵化出的幼虫转移至培养瓶中饲养。每头羽化出的成虫分别与 W^{1118} 果蝇杂交，挑取后代中的红眼个体即为转基因果蝇。将筛选得到的红眼转基因果蝇与平衡子 BDSC#3619 果蝇杂交，获得纯合稳定的转基因果蝇品系 UAS-*LsCarE1*^{Optimized}；将纯合转基因果蝇 UAS-*LsCarE1*^{Optimized}与 GAL4 启动品系 BDSC#8641 杂交，获得启动超量表达灰飞虱 *LsCarE1* 的果蝇品系 da > *LsCarE1*^{Optimized}；da > gal4 是 BDSC#35568 果蝇与 GAL4 启动品系 BDSC#8641 杂交后代，其遗传背景与 da > *LsCarE1*^{Optimized}完全一致，作为对照品系。

1.6　转基因果蝇中目标基因的检测

以启动超量表达目的基因的果蝇 da > *LsCarE1*^{Optimized}为实验组，以 UAS-*LsCarE1*^{Optimized}和 da > gal4 果蝇品系为对照组。分别挑选实验组和对照组 4－5 日龄雌成虫，用于目标基因的检测。运用 Beacon Designer 7 软件设计实时荧光定量 PCR 引物（表 1），以黑腹果蝇 β-肌动蛋白基因（*β-Actin*）和核糖体蛋白 L32 基因（*RPL*32）为内参基因（Mao *et al.*, 2007）。同时搜索黑腹果蝇体内与灰飞虱 *LsCarE*1 基因同源的内源酯酶基因，检测果蝇内源酯酶基因表达量情况。参照 SYBR® *Premix Ex Taq*™（Takara）试剂盒说明书，建立 20 μL 反应体系，反应程序：95℃ 30 s；95℃ 5 s，60℃ 34 s，40 个循环；95℃ 15 s，60℃ 60 s，95℃ 15 s，60℃ 15 s。

1.7　生物测定

取 4－5 日龄的 da > *LsCarE1*^{Optimized}和 da > gal4 品系雌性果蝇，分别进行生物测定。以丙酮为溶剂，将不同杀虫剂配制成一定浓度的母液，通过梯度稀释成系列浓度。将供试果蝇用 CO_2 麻醉处理，用镊子夹住其翅，取 0.25 μL 的不同浓度的供试药剂用自动微量点滴仪（Burkard 公司）点滴于果蝇前胸背板中央，以点滴丙酮作为对照。每个浓度处理 20 头果蝇，重复 3 次。点滴完毕后将果蝇置于有新鲜培养基的培养瓶中饲养，毒死蜱和溴氰菊酯处理 24 h 后统计死亡数，吡虫啉处理 72 h 后统计死亡数。

1.8　数据统计与分析

荧光定量 PCR 数据利用 ABI Prism 7500 SDS 1.1 软件进行分析；基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算，使用 SPSS 19.0 软件进行统计分析，采用双样本 *t* 检验或邓肯氏多样本间差异测验比较目标基因在各品系中的表达量的差异。生物测定数据用 Polo Plus 软件的 Probit 方法计算 LC_{50}、斜率和标准误等。

2　结果

2.1　三个抗性灰飞虱品系中 *LsCarE*1 的表达量分析

我们在已测的灰飞虱转录组数据（未发表数据）中发现，*LsCarE*1 在抗毒死蜱、抗吡虫啉和抗溴氰菊酯 3 个灰飞虱抗性品系雌成虫中均有过量表达的现象。定量 PCR 证实，*LsCarE*1 在抗吡虫啉品系中的表达量是敏感品系中表达量的 3 倍；*LsCarE*1 在抗毒死蜱品系和抗溴氰菊酯品系中的表达量虽然有 1.75～1.89 倍的提高，但与敏感品系相比差异不显著（图 1）。

2.2　转基因果蝇品系的建立和目标基因表达量的检测

将构建好的转基因质粒 pUAST-attB-*LsCarE1*^{Optimized}通过显微注射的方法导入新鲜果蝇胚胎。注射 pUAST-attB-*LsCarE1*^{Optimized}质粒的胚胎成功孵化出 7 头果蝇成虫，将它们分别与 W^{1118} 品系回交，其中有 2 对果蝇的后代为红眼的转基因果蝇（转化效率约为 28.6%）。将上述转基因果蝇与平衡子果蝇杂交，筛选获得纯合的转基因果蝇品系 UAS-*LsCarE1*^{Optimized}。将纯合的转基因果蝇品系 UAS-*LsCarE1*^{Optimized}与 GAL4 启动品系 da-gal4 杂交，得到超量表达目的基因的 da > *LsCarE1*^{Optimized}品系。

通过定量 PCR 的方法检测了目标基因 *LsCarE*1 在超量表达品系 da > *LsCarE1*^{Optimize}以及两个对照品系即 UAS-*LsCarE1*^{Optimized}和 da > gal4 中的相对表达量，同时也检测了黑腹果蝇中与目标基因 *LsCarE*1 序列相似性最高的 3 个内源酯酶基因 *RE*16761（氨基酸序列一致性 36%），*F*121496（氨基酸序列一致

性 36%)和 *RE*24825(氨基酸序列一致性 36%)的表达情况。结果显示,目标基因 *LsCarE*1 在超量表达品系 da > *LsCarE1*^{Optimized}中的表达量是对照品系 UAS-*LsCarE1*^{Optimized}中表达量的 257.3 倍;而 da > gal4 对照品系中没有检测到 *LsCarE*1 的表达。果蝇内源酯酶基因 *RE*16761, *F*121496 和 *RE*24825 表达量显著低于目标基因的表达量(图 2)。因此,*LsCarE*1 在果蝇中超量表达。

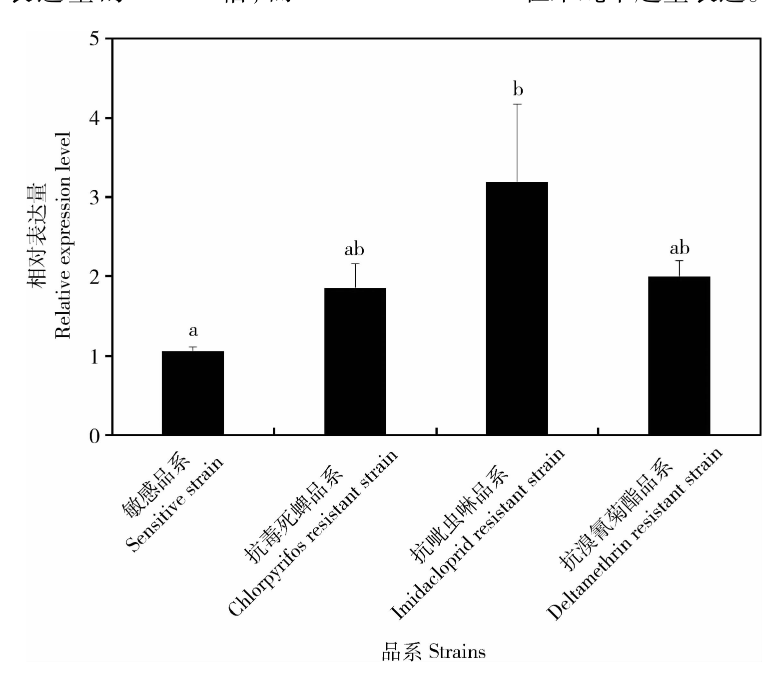


图 1 *LsCarE*1 在 3 个灰飞虱抗性品系雌成虫中的相对表达量

Fig. 1 Relative expression levels of *LsCarE*1 in female adults of three resistant strains of *Laodelphax striatellus*

柱上不同字母表示差异显著($P < 0.05$),采用双样本 t 检验法。Different letters above the bars indicate significant difference ($P < 0.05$) by two-sample t-test.

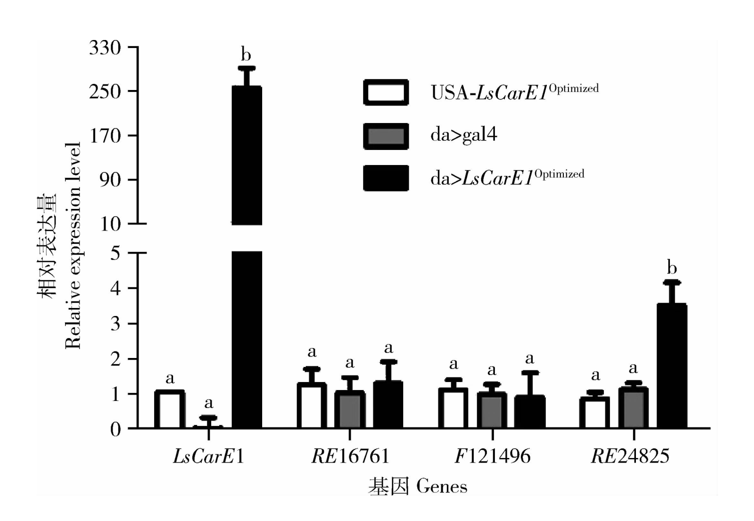


图 2 转基因果蝇中 *LsCarE*1 和内源酯酶基因的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of *LsCarE*1 and the endogenous esterase genes in transgenic *Drosophila melanogaster*

柱上不同字母表示差异显著($P < 0.05$),采用邓肯氏多样本间差异测验。Different letters above the bars indicate significant difference ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

2.3 超量表达 *LsCarE*1 的果蝇对毒死蜱、吡虫啉和溴氰菊酯的生物测定

在上述定量 PCR 检测中,由于对照组果蝇 da > gal4 与 UAS-*LsCarE1*^{Optimized}中靶基因 *LsCarE*1 和内源酯酶基因的表达量都显著低于实验组果蝇 da > *LsCarE1*^{Optimized};此外,da > gal4 与 da > *LsCarE1*^{Optimized}

果蝇的遗传背景完全一致。因此，在接下来的生物测定试验中仅以 da > gal4 果蝇作为对照品系。

生物测定结果显示，与对照组 da > gal4 果蝇品系相比，在 7.8, 12.5, 20 和 32 mg/L 毒死蜱的处理下，启动 *LsCarE*1 超量表达的转基因果蝇品系 da > *LsCarE1*^{Optimized}的死亡率显著低于对照组果蝇，两个品系的 LC_{50}值分别为 10.58(6.77 ~ 15.81) 和 54.8 (33.10 ~ 90.92) mg/L。因此，启动灰飞虱 *LsCarE*1 超量表达的实验组果蝇对毒死蜱的抗药性有显著提高，抗性提高倍数为 4.19(表 2)。在 40 ，80, 160, 320 和 640 mg/L 吡虫啉的处理下，启动 *LsCarE*1 超量表达的转基因果蝇品系 da > *LsCarE1*^{Optimized}的死亡率显著低于对照组果蝇，两个品系的 LC_{50} 值分别为 138.17 (117.20 ~ 161.86) 和 477.79 (391.79 ~ 625.30) mg/L。因此，启动 *LsCarE*1 表达的实验组果蝇对吡虫啉的抗性有显著提高，抗性提高倍数为 2.46(表 2)。在 5, 10, 20, 40 和 80 mg/L 溴氰菊酯的处理下，虽然启动 *LsCarE*1 超量表达的转基因果蝇品系 da > *LsCarE1*^{Optimized}品系果蝇的死亡率低于对照组果蝇，但是两者的差异不显著，LC_{50}值分别为 35.30(27.90 ~ 46.98) mg/L 和 47.79(36.54 ~ 69.26) mg/L)(表 2)。因此，超量表达 *LsCarE*1 的果蝇对毒死蜱和吡虫啉的耐药性得到了显著提高。

表 2 转基因果蝇品系在不同浓度杀虫剂处理下的死亡率

Table 2 Dosage-mortality responses of transgenic *Drosophila melanogaster* to different concentrations of insecticides

杀虫剂 Insecticides	品系 Strains	χ^2	斜率 Slope ± *SE*	LC_{50} (95% CI) (mg/L)	抗性比 * Resistance ratio
毒死蜱 Chlorpyrifos	da > gal4	12.64	4.08 ± 0.38	10.58 (6.77 – 15.81)	1.00
	da > *LsCarE1*^{Optimized}	6.84	2.46 ± 0.44	54.8 (33.10 – 90.92)	5.19
吡虫啉 Imidacloprid	da > gal4	1.70	2.61 ± 0.26	138.17 (117.20 – 161.86)	1.00
	da > *LsCarE1*^{Optimized}	0.84	2.39 ± 0.34	477.79 (391.79 – 625.30)	3.46
溴氰菊酯 Deltamethrin	da > gal4	2.60	1.59 ± 0.210	35.30 (27.90 – 46.98)	1.00
	da > *LsCarE1*^{Optimized}	2.04	1.50 ± 0.22	47.79 (36.54 – 69.26)	1.35

* 抗性比 Resistance ratio = LC_{50} of da > *LsCarE1*^{Optimized}/LC_{50} of da > gal4.

3 讨论

本研究通过转基因果蝇超量表达技术成功验证了在抗性灰飞虱品系中过量表达的解毒酶基因 *LsCarE*1 与杀虫剂抗药性的关系。Zhang 等(2012) 曾经报道了灰飞虱 LsCarE1 与毒死蜱抗性相关的现象，他们在抗毒死蜱灰飞虱 YN-CPF 品系中发现，*LsCarE*1 不仅在 RNA 水平上过量表达 32.06 倍，而且免疫印迹表明 LsCarE1 在蛋白水平上也显著高于对照敏感品系(Zhang YL *et al*., 2013)。但是，他们并没有开展进一步的功能验证工作。本研究不仅成功验证了灰飞虱 *LsCarE*1 的过量表达与毒死蜱抗性的关系，而且还发现 *LsCarE*1 的过量表达与吡虫啉的抗性也是相关的。因此，灰飞虱 LsCarE1 能够介导多种杀虫剂的解毒代谢，是灰飞虱对多种药剂产生交互抗性的机制之一。灰飞虱 LsCarE1 属于 β-酯酶(β-esterase)，该类酯酶基因数目在昆虫中很少，但是它们的功能却十分多样，可以介导多种杀虫剂和其他异源物质的代谢(任娜娜等，2014)。本文的研究结果再一次提供了灰飞虱 β-酯酶 LsCarE1 介导多种杀虫剂抗性形成的实验证据。

本研究中超量表达 *LsCarE*1 的果蝇对溴氰菊酯的抗性只增加了 1.35 倍，推测原因可能如下：转基因果蝇在超量表达靶基因的同时，果蝇的正常生理会受到一定的影响，包括适合度代价以及各种可能的反馈抑制作用。由于超量表达靶基因的果蝇品系相对于对照品系有较低的生物适合度，因此，在理论上超量表达靶基因的果蝇对杀虫剂的反应会出现 3 种类型：第 1 种是对特定杀虫剂的敏感性增加，由于靶基因的表达产物对该杀虫剂没有解毒作用，而且超量表达靶基因的适合度代价降低了试虫对药剂的耐受能力。第 2 种类型是对特定杀虫剂抗性没有显著影响，由于靶基因的表达产物对该杀虫剂的解毒作用较小，仅能抵消适合度代价带来的副作用。第 3 种类型是对特定杀虫剂的抗药性有提高，表明靶基因的表达产物可以有效降解该杀虫剂，不仅可以抵消适合度代价带来的副作用，而且能够体现出对药剂的解毒代谢作用。例如，本研究中 da > *LsCarE1*^{Optimized}果蝇品系对溴氰菊酯的抗性提高 1.35

倍。这 1.35 倍的差异是果蝇在抵消了生物适合度代价后,表现出来的抗药性差异。如果能够进一步设置一个超量表达无关基因的果蝇品系作为阴性对照,比如 da > *GFP* 品系,在排除生物适合度代价这个背景噪音后,可以更准确地反映超量表达靶基因与杀虫剂抗药性之间的关系。

综上所述,本研究在发现 *LsCarE*1 在 3 个不同的抗性灰飞虱品系中过量表达的基础上,通过超量表达技术和农药生物测定验证了 *LsCarE*1 的过量表达与灰飞虱抗性的关系。研究结果有助于深入了解羧酸酯酶介导抗药性的分子机理,也有利于促进高效、低毒、环保的新型杀虫剂的研发和应用。

参考文献(References)

Daborn PJ, Lumb C, Harrop TWR, Blasetti A, Pasricha S, Morin S, Mitchell SN, Donnelly MJ, Müller P, Batterham P, 2012. Using *Drosophila melanogaster* to validate metabolism-based insecticide resistance from insect pests. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 42: 918 – 924.

Elzaki MEA, Zhang WF, Feng A, Qiou XY, Zhao WX, Han ZJ, 2016. Constitutive overexpression of cytochrome P450 associated with imidacloprid resistance in *Laodelphax striatellus* (Fallén). *Pest Manag. Sci.*, 72(5): 1051 – 1058.

Feng A, 2013. Biochemical and Molecular Mechanisms for Imidacloprid Resistance in *Laodelphax striatellus* in China. MSc Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [冯爱, 2013. 灰飞虱对吡虫啉抗性的生理生化及分子机制研究. 南京: 南京农业大学硕士学位论文]

Gao BL, 2008. Insecticides Resistance in Small Brown Planthopper, *Laodelphax striatellus* (Fallen) and the Mechanisms. PhD Dissertation, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [高保立, 2008. 灰飞虱抗药性及其机理研究. 南京: 南京农业大学博士学位论文]

Huvenne H, Smagghe G, 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *J. Insect Physiol.*, 56: 227 – 235.

Kisimoto R, 1989. Flexible diapause response to photoperiod of a laboratory selected line in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* Fallén. *Appl. Entomol. Zool.*, 24(1): 157 – 159.

Lima EP, Paiva MHS, de Arajo AP, de Araújo AP, da Silva ÉVG, da Silva UM, de Oliveira LN, Santana AEG, Barbosa CN, de Paiva Neto CC, Goulart MO, Wilding CS, Ayres CFJ, de Melo Santos MAV, 2011. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasit. Vectors*, 4(1): 5.

Liu HX, Leng PE, Xu RQ, Ji SH, Liu Y, 2012. Comparison of the biochemical characteristics of deltamethrin resistant and susceptible populations of *Aedes albopictus*. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 49(2): 403 – 407. [刘洪霞, 冷培恩, 徐仁权, 姬淑红, 刘曜, 2012. 白纹伊蚊溴氰菊酯抗性和敏感品系羧酸酯酶性质的比较. 应用昆虫学报, 49(2): 403 – 407]

Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY, 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotechnol.*, 25(11): 1307 – 1313.

Ren NN, Xie M, You YC, You MS, 2014. An overview on the study of insect carboxylesterases (COEs) and the COE-mediated resistance to insecticides. *J. Fujian Agric. For. Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 43(4): 337 – 344. [任娜娜, 谢苗, 尤燕春, 尤民生, 2014. 羧酸酯酶及其介导昆虫抗药性的研究进展. 福建农林大学学报(自然科学版), 43(4): 337 – 344]

Spradling AC, Rubin GM, 1982. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science*, 218(4570): 341 – 347.

Wang GF, Zhang YJ, Bo LY, Wu QJ, Xu BY, Zhu GR, 2003. Effect of spinosad on the polyphenol oxidase and carboxyl esterase in beet armyworm, *Spodopetera exigua* (Hübner). *Chin. J. Pestic. Sci.*, 5(2): 40 – 46. [王光峰, 张友军, 柏连阳, 吴青君, 徐宝云, 朱国仁, 2003. 多杀菌素对甜菜夜蛾多酚氧化酶和解毒酶活性的影响. 农药学学报, 5(2): 40 – 46]

Wang R, Fu R, Yang QW, Mu LL, Wu M, 2016. Identification of reference genes in resistant small brown plant hopper, *Laodelphax striatellus*. *J. Nanjing Agric. Univ.*, 39(5): 763 – 770. [王芮, 符蓉, 杨倩文, 慕莉莉, 吴敏, 2016. 抗药性灰飞虱稳定内参基因的筛选. 南京农业大学学报, 39(5): 763 – 770]

Xing J, Liang P, Gao XW, 2011. Effects of sublethal concentrations of chlorantraniliprole on insecticide susceptibility and detoxifying enzyme activity in *Plutella xylostella*. *Chin. J. Pestic. Sci.*, 13(5): 464 – 470. [邢静, 梁沛, 高希武, 2011. 亚致死浓度氯虫苯甲酰胺对小菜蛾药剂敏感度和解毒酶活性的影响. 农药学报, 13(5): 464 – 470]

Xu L, 2013. Studies on Chlorpyrifos and Deltamethrin Resistance in Small Brown Planthopper, *Laodelphax striatellus* and Possible Mechanisms in China. PhD Dissertation, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [徐鹿, 2013. 灰飞虱对毒死蜱和溴氰菊酯的抗性及其机理的研究. 南京: 南京农业大学博士学位论文]

Xu L, Wu M, Han ZJ, 2013. Overexpression of multiple detoxification genes in deltamethrin resistant *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) in China. *PLoS ONE*, 8(11): e79443.

Xu L, Wu M, Han ZJ, 2014. Biochemical and molecular characterisation and cross-resistance in field and laboratory chlorpyrifos-resistant strains of *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) from eastern China. *Pest Manag. Sci.*, 70(7): 1118 – 1129.

Zhang JQ, Li DQ, Ge PT, Yang ML, Guo YP, Zhu KY, Ma EB, Zhang JZ, 2013. RNA interference revealed the roles of two carboxylesterase genes in insecticide detoxification in *Locusta migratoria*. *Chemosphere*, 93(6): 1207 – 1215.

Zhang YL, Guo HF, Yang Q, Li S, Wang LH, Zhang GF, Fang JC, 2012. Overexpression of a P450 gene (*CYP6CW1*) in buprofezin-resistant *Laodelphax striatellus* (Fallén). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 104: 277 – 282.

Zhang YL, Li S, Xu L, Guo HF, Zi JY, Wang LH, He P, Fang JC, 2013. Overexpression of carboxylesterase-1 and mutation (F439H) of acetylcholinesterase-1 are associated with chlorpyrifos resistance in *Laodelphax striatellus*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 106(1): 8 – 13.

(责任编辑: 赵利辉)